

# Désacidification biocatalysée des huiles hyperacides en réacteur continu

A. DUCRET<sup>(1)</sup>, D. MONTET<sup>(1)</sup>, M. PINA<sup>(1)</sup>, J. GRAILLE<sup>(2)</sup>

**Résumé.** — Les conditions utilisées en batch pour la désacidification des huiles hyperacides par réestérification biocatalysée par des lipases des acides gras libres avec des glycérides partiels sont mises en oeuvre en système continu. En utilisant une huile acide modèle à 40 % d'acidité, après avoir testé sans résultat probant successivement un réacteur à lit catalytique fixe sans et avec piégeage de l'eau formée *in situ*, puis un réacteur continu alimenté par différence de pression, nous avons mis au point un réacteur continu sous pression réduite donnant satisfaction. Les résultats obtenus sont très encourageants puisqu'il suffit de traiter l'huile à désacidifier par 2 passages successifs à l'intérieur du réacteur pour que l'acidité soit réduite de 90 %.

**Mots clés.** — Huiles hyperacides, désacidification enzymatique, réestérification, réacteur continu, pression réduite

## INTRODUCTION

Les huiles alimentaires sont généralement raffinées avant d'être commercialisées, afin de répondre aux critères de qualité requis. Cependant, l'acidité très élevée de certaines huiles tropicales (> 10 %) rend ces huiles difficilement raffinables par les méthodes classiques et ceci pour deux raisons essentielles :

- l'une technologique, la forte teneur en savons après neutralisation provoque la formation d'émulsions irréductibles,
- l'autre économique : pertes importantes au raffinage.

La réduction de l'acidité en dessous d'une valeur inférieure à 5 % rendrait le raffinage plus aisé, plus efficace, moins coûteux et limiterait les pertes. Une solution séduisante au problème du traitement des huiles hyperacides était de réestérifier par voie enzymatique dans des conditions douces les acides gras libres avec les glycérides partiels de l'huile [1]. Dans un premier temps, en utilisant des lipases en milieu très légèrement hydraté, l'étude a consisté à mettre au point en batch, sur un substrat modèle acide, des conditions opératoires idoines de désacidification enzymatique, de manière à faire chuter l'acidité en dessous de 5 %, seuil compatible avec le raffinage à la soude [2-3]. Par la suite, les conditions optimisées ont pu être efficacement mises en oeuvre sur une huile de palme hyperacide et sur une huile de tournesol hydrolysée. Toutefois, ces mêmes conditions n'ont pas pu être appliquées telles quelles à l'huile de son de riz dont la fraction "oryzanol" non glycéridique est soupçonnée d'être l'inhibiteur principal du catalyseur enzymatique [4].

Pour clore cette étude, le présent travail a consisté à tester la faisabilité de la mise en oeuvre du procédé en réacteur continu sur le corps gras acide modèle en vue de réduire les coûts de l'opération et de considérer une possible application industrielle.

## MATERIELS ET METHODES

### Huile modèle

Un corps gras acide est reconstitué en mélangeant à de l'acide oléique technique de la "monooléine" (FLUKA) contenant des triglycérides, des diglycérides, des monoglycérides et une faible quantité de glycérol. La quantité stoechiométrique d'acides gras à ajouter est déterminée par analyse des différents constituants de la monooléine par CCM [2]. L'acidité est de l'ordre de 40 %.

### Biocatalyseurs

Les biocatalyseurs mis en oeuvre en réacteur continu (Lipozyme<sup>TM</sup>, lipase de *Mucor miehei* et lipase SP435L fournis par NOVO Industri) sont ceux ayant donné les meilleurs résultats dans la mise au point de la réaction en batch [2-3].

### Désacidification en réacteur continu à lit fixe

Le réacteur utilisé est une colonne de verre (diamètre interne 1 cm, longueur 25 cm) équipée d'une double enveloppe permettant par circulation d'un flux d'eau thermorégulée de maintenir la température à 60 °C. La colonne est remplie avec 16 g de Lipozyme ou 12 g de Lipozyme additionnés de 6 g de tamis moléculaire (3 Å). Les temps de séjour varient entre 9 et 100 min ce qui correspond à des débits compris entre 5 et 0,56 ml/min. Le mélange réactionnel, maintenu sous agitation magnétique dans un erlenmeyer à 60 °C grâce à un bain-marie thermorégulé, est amené au bas du réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson Minipuls 2). Le corps gras désacidifié est récupéré en sortie de colonne.

### Désacidification en réacteur continu sous pression réduite

Les réacteurs et les conditions opératoires utilisées seront détaillées dans la partie "résultats et discussion".

### Rendement de désacidification

Le rendement de la réaction est toujours déterminé à partir de la diminution de l'acidité du milieu calculée comme suit :  
Rendement % =  $\frac{|\text{Acidité } (t_0) - \text{Acidité } (t_f)|}{\text{Acidité } (t_0)} \times 100$ .

(1) Laboratoire de Lipotechnie, CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier cedex, France

(2) Laboratoire de Lipotechnie, CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier cedex, France. A qui toute correspondance doit être adressée

### Acidité des huiles

L'acidité est dosée selon la norme AFNOR [5].

### Quantité d'eau dans les huiles

La teneur en eau des huiles est déterminée par la méthode de Karl Fisher à l'aide d'un titrimètre automatique à lecture directe BAIRD et TATLOCK type AF3.

### Activité de l'eau ( $a_w$ )

Les mesures sont effectuées à 25 °C à l'aide d'un Thermoconstanter Novasina RTD-33, TH2 après calibrage de l'appareil avec des sels étalons à  $a_w$  connus.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les conditions opératoires de désacidification des huiles hyperacides, basées sur la réestérification enzymatique des acides gras libres avec les glycérides partiels mises au point en batch et optimisées selon un plan d'expérience, permettent effectivement de diminuer l'acidité en-dessous du seuil de 5 % en faisant varier les paramètres suivants : température, pression, proportion du biocatalyseur. Les valeurs optimales définies, à savoir 60 °C, 20 mm Hg et 5.5 % (w/w) de biocatalyseur, ont permis d'obtenir des rendements de désacidification de 93 % [3]. L'intérêt de cette réaction s'en trouverait encore accru si le procédé de désacidification pouvait s'effectuer en continu. L'utilisation d'enzymes immobilisées (ayant donné déjà les meilleurs résultats en batch) devrait faciliter l'extrapolation du procédé. Les différents essais ont été effectués en biocatalysant la réaction avec le Lipozyme sur le mélange acide modèle à 40.5 % d'acidité. Il aurait également été souhaitable d'utiliser en réacteur continu la lipase SP435L qui s'est avérée être très performante en batch. Toutefois, cette enzyme n'étant pas encore commercialisée et compte tenu des quantités nécessaires, il n'a pas été possible de l'utiliser dans nos essais.

### Réacteurs continus à lit catalytique fixe

Le principe du réacteur continu à lit fixe est le suivant : l'huile à désacidifier est pompée à travers une colonne thermorégulée et remplie de catalyseur. Elle est ensuite récupérée en sortie du réacteur en plusieurs fractions correspondant chacune au volume mort de la colonne (Fig. 1).

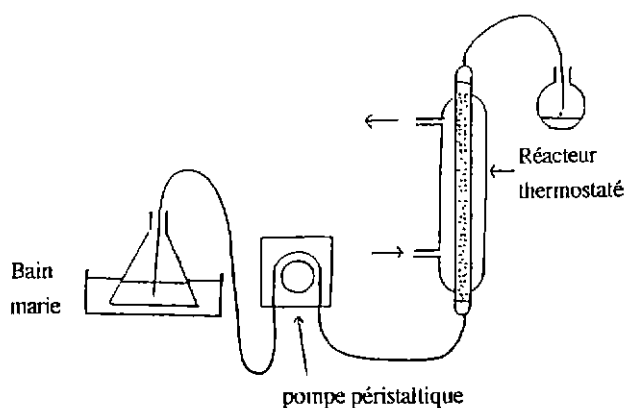


FIG. 1. — Schéma du réacteur continu à lit fixe

TABLEAU I. — Désacidification en fonction du temps de passage

	Nombre de volume morts <sup>(1)</sup>				
	1	2	3	4	5
Débit = 4,8 ml/min TC ≈ 9 min <sup>(2)</sup>					
Acidité (%)	31,1	31,1	31,6	31,8	31,7
Rendement (%)	23,3	23,2	21,9	21,5	21,7
Débit = 1,75 ml/min TC ≈ 25 min					
Acidité (%)	30,4	30,0	29,6	28,9	28,9
Rendement (%)	24,9	25,9	26,9	28,6	28,6
Débit = 0,45 ml/min TC ≈ 100 min					
Acidité (%)	40,5	29,7	28,8	28,8	28,8
Rendement (%)	—	27,1	28,9	28,9	28,9

(1) volume mort = 44 ml

(2) acidité à  $t_0$  = 40,5 %

TABLEAU II. — Evolution de la quantité d'eau et de l' $a_w$  en fonction du temps de passage

	Nombre de volume morts <sup>(1)</sup>					
	0	1	2	3	4	5
Débit = 4,8 ml/min TC ≈ 9 min						
H <sub>2</sub> O (% p/p)	0,47	1,02	1,02	0,91	0,92	0,91
$a_w$ <sup>(2)</sup>	0,34	0,55	0,53	0,49	0,49	0,49
Débit = 1,75 ml/min TC ≈ 25 min						
H <sub>2</sub> O (% p/p)	0,47	0,90	0,90	0,90	0,91	0,92
$a_w$	0,34	0,54	0,54	0,52	0,51	0,51
Débit = 0,45 ml/min TC ≈ 100 min						
H <sub>2</sub> O (% p/p)	0,47	0,82	1,25	1,01	1,0	1,0
$a_w$	0,34	0,57	0,52	0,52	0,52	0,52

(1) volume mort = 44 ml

(2)  $a_w$  (Lipozyme) = 0,46

### Influence du temps de passage

La température étant fixée à 60 °C à l'intérieur de la colonne et la quantité d'enzyme à 16 g de Lipozyme, le seul paramètre que l'on fait varier est le temps de contact (TC) entre l'enzyme et le substrat dans le réacteur. Il est directement relié au débit par la relation : TC (min) = volume mort de la colonne (ml)/débit (ml/min). La réaction a été étudiée avec 3 TC différents (Tableau I). Dans tous les cas, il est nécessaire d'attendre le passage de 3 à 4 volumes morts de colonne pour atteindre le régime permanent, ce qui correspond à une acidité finale constante. Toutefois, les rendements obtenus sont faibles (inférieurs à 30 %). De plus, les rendements ne sont pas proportionnels au temps de contact entre l'huile et l'enzyme. Avec un TC de 20 min, un palier à 29 % de rendement est atteint et l'accroissement du temps de séjour de l'huile dans le réacteur ne permet pas d'améliorer le rendement. Tout se passe comme s'il y avait un facteur qui limite la réaction de désacidification, ou autrement dit la réaction de réestérification.

### Influence de l'eau

Dans la réaction de réestérification, l'eau a une grande influence sur l'orientation de la réaction et l'on peut supposer que l'eau générée précédemment dans le réacteur est la cause de son manque d'efficacité. En conséquence, nous avons suivi l'activité de l'eau et la quantité d'eau dans les différents échantillons d'huile récupérées en sortie de réacteur pour les 3 temps de contacts précédents (Tableau II). Dans tous les cas, on remarque que la quantité d'eau présente dans l'huile

a considérablement augmenté et représente quasiment 1 % de l'huile en poids. L' $a_w$  correspondante croît jusqu'à 0,5 alors que l' $a_w$  dans la réaction optimisée en batch n'est que de 0,3.

Afin de montrer que les faibles rendements obtenus sont effectivement dus à la présence d'eau dans l'huile, on a essayé d'éliminer cette eau en la piégeant dans du tamis moléculaire 3 Å (Tableau III). Conformément à notre attente, le rendement initial est amélioré puisqu'il est supérieur à 55 %. Cependant, il chute par la suite très rapidement car le tamis est saturé d'eau. Toutefois, on aurait pu s'attendre à constater une augmentation de l' $a_w$  jusqu'à 0,5 comme dans les essais précédents ne contenant pas de tamis moléculaire. Or, si l' $a_w$  augmente légèrement, elle reste toutefois inférieure à 0,4. L' $a_w$  mesurée sur l'huile en sortie de réacteur est donc proche de celle obtenue avec les réactions en batch ( $a_w = 0,3$ ), mais dans ce cas les rendements restent très faibles (inférieurs à 20 %). On peut expliquer ces résultats par le fait que l' $a_w$  est mesurée sur l'huile à la sortie du réacteur. En fait, à l'intérieur du réacteur, une grande proportion d'eau reste piégée dans le tamis et doit augmenter de façon très significative l' $a_w$  du milieu. En conséquence l'enzyme n'est plus dans les conditions optimales pour permettre de reproduire les excellents rendements obtenus en "batch".

Cet ensemble de résultats montre que l'utilisation du lit catalytique fixe afin de réaliser la réaction de désacidification en continu semble inadaptée. Il faut donc concevoir un réacteur dont le principe de mise en oeuvre permettra d'éliminer l'eau en continu.

TABLEAU III. — Réacteur à lit fixe<sup>(1)</sup> avec piégeage de l'eau par du tamis moléculaire pour un temps de contact d'une heure

	Nombre de volume morts <sup>(2)</sup>					
	0	1	2	3	4	5
Acidité (%)	40,5	17,7	28,7	32,3	33,1	33,4
Rendement (%)	—	56,3	29,1	20,0	18,3	17,5
H <sub>2</sub> O (% p/p)	0,26	0,15	0,36	0,43	0,46	0,53
$a_w$ <sup>(2)</sup>	0,31	0,28	0,34	0,35	0,37	0,38

(1) réacteur à lit catalytique fixe = 12 g Lipozyme + 6 g tamis moléculaire

(2) volume mort = 29,3 ml

## REACTEURS CONTINUS SOUS PRESSION REDUITE

Comme dans le cas des réactions mises en oeuvre en batch, l'élimination en continu de l'eau générée au cours de l'estérification pourrait être rendue possible en plaçant le réacteur sous une pression suffisamment réduite pour permettre l'évaporation de l'eau nouvellement formée à la température de la réaction. Toutefois, l'adaptation en réacteur continu de cette opération somme toute aisée en batch est beaucoup plus délicate dans ce cas et a nécessité plusieurs essais pour concevoir un procédé efficace

### Essai préliminaire - Alimentation du réacteur par différence de pression (Fig. 2)

La circulation de l'huile en continu dans le système est assurée par aspiration de l'huile grâce à des différences de pression exercées entre d'une part le milieu de départ (760 mmHg) et le réacteur constitué d'un ballon de 250 ml triple col (50 mmHg) et d'autre part ce même réacteur et l'huile récupérée en sortie (15 mmHg). La quantité d'huile dans le réacteur est maintenue constante (50 g) grâce au tuyau de sortie muni d'un filtre en verre fritté relié à la pompe à vide n° 2. Le temps de contact entre l'huile et le biocatalyseur (5 g) dans le réacteur est réglé en fixant le débit d'entrée de l'huile dans le réacteur à l'aide de la vanne micrométrique n° 1. Le prélèvement des échantillons d'huile

désacidifiée s'effectue après fermeture de la vanne micrométrique n° 2 ce qui permet de ne pas modifier la pression réduite à l'intérieur du réacteur qui est alors assurée par la pompe à vide n° 1.

La réaction est suivie en continu et lorsque le régime permanent est atteint, c'est-à-dire quand l'acidité finale obtenue est constante, le rendement de désacidification est égal à 29,5 % ce qui est faible par rapport aux rendements obtenus en batch. On pourrait envisager d'améliorer ce résultat en diminuant la pression ce qui est toutefois difficilement réalisable avec ce montage. En effet, la différence de pression entre le réacteur et le milieu final doit être suffisamment importante pour pouvoir aspirer l'huile désacidifiée et compenser les pertes de charges importantes dans la tuyauterie.

### Procédé amélioré (Fig. 3)

Le réacteur est constitué d'un flacon triple entrée contenant 50 g d'huile à traiter et 5 g de Lipozyme sous agitation magnétique douce. Le réacteur est muni d'une poche filtrante empêchant le passage du biocatalyseur. Le système de double pompe à vide permettant de récupérer l'huile désacidifiée est conservé comme dans le cas précédent. Dans ce cas, le ballon collecteur de l'huile désacidifiée est un ballon triple col, muni chacun d'un robinet, et relié aux deux pompes à vide et au réacteur ce qui permet de le retirer sans changer la pression interne du montage.

La circulation de l'huile dans le nouveau montage ne repose plus sur la différence de pression entre les compartiments. Le réacteur et le récipient contenant l'huile désacidifiée sont maintenus sous une même pression réduite (< 25 mmHg) qui peut être contrôlée. L'huile désacidifiée ne quitte plus le réacteur par aspiration comme dans le cas précédent mais par un système de trop-plein. Afin d'assurer d'une part un meilleur contact entre l'huile et le biocatalyseur et ne surtout pas subir d'autre part un phénomène de dépression, l'huile acide au départ est introduite par le bas du réacteur et le débit d'entrée (directement relié au temps de contact huile/Lipozyme dans le réacteur) est réglé à l'aide d'une pompe péristaltique.

Avec ce nouveau montage, on a fait varier la pression à l'intérieur du réacteur et le temps de contact enzyme/substrat tout en maintenant constants la température à 60 °C et le rapport pondéral enzyme/substrat égal à 10 %.

Pour chaque essai, la réaction a été suivie jusqu'à obtention du régime permanent atteint après passage dans le réacteur d'un volume correspondant à 5 ou 6 volumes morts et pour lequel l'acidité finale est constante. Les résultats obtenus avec le Lipozyme sur le système stabilisé pour des pressions réduites de 8, 12 et 25 mmHg sont indiqués dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Désacidification en réacteur continu en fonction de la pression réduite et du temps de contact enzyme/substrat

		Pression (mmHg)	Acidité <sup>(1)</sup> (%)	Rendement (%)
TC (h)	2	8	26,3	35
	6	8	17,0	58
	13	8	8,1	80
	3	12	27,5	32
	6	12	21,1	48
	12	12	16,2	60
	4	25	28,3	30
	8	25	23,3	42
	13	25	21,9	46

(1) acidité à  $t_0 = 40,5$  %

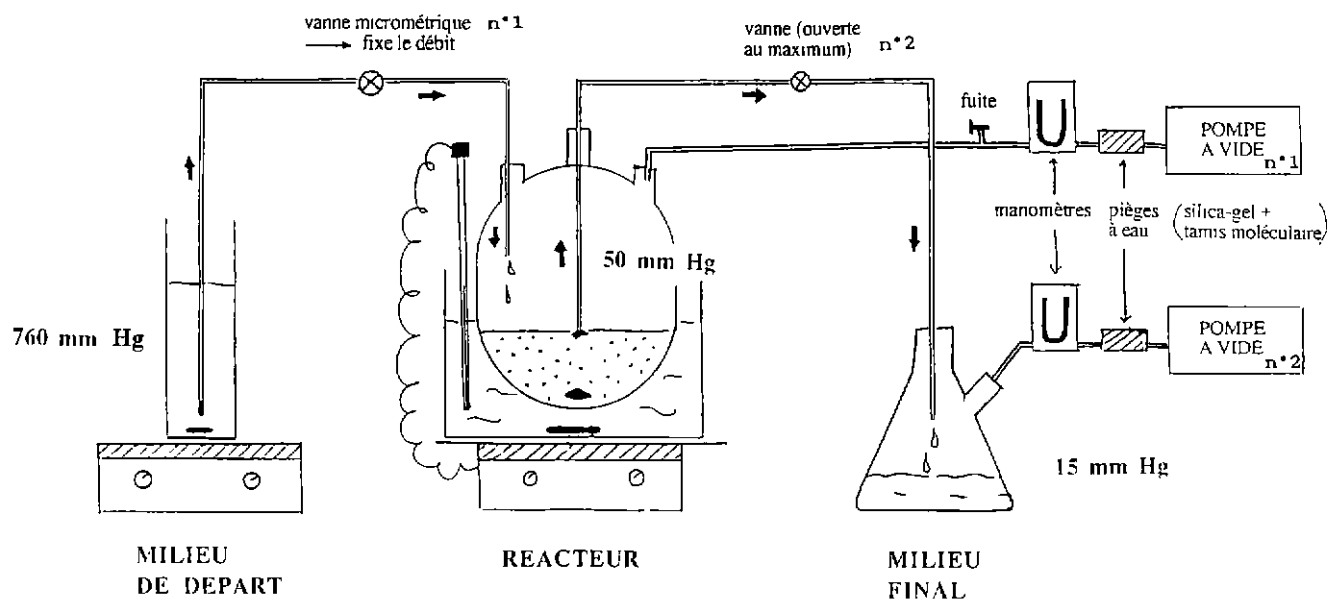


FIG. 2. — Réacteur en continu alimenté par circulation de l'huile par aspiration

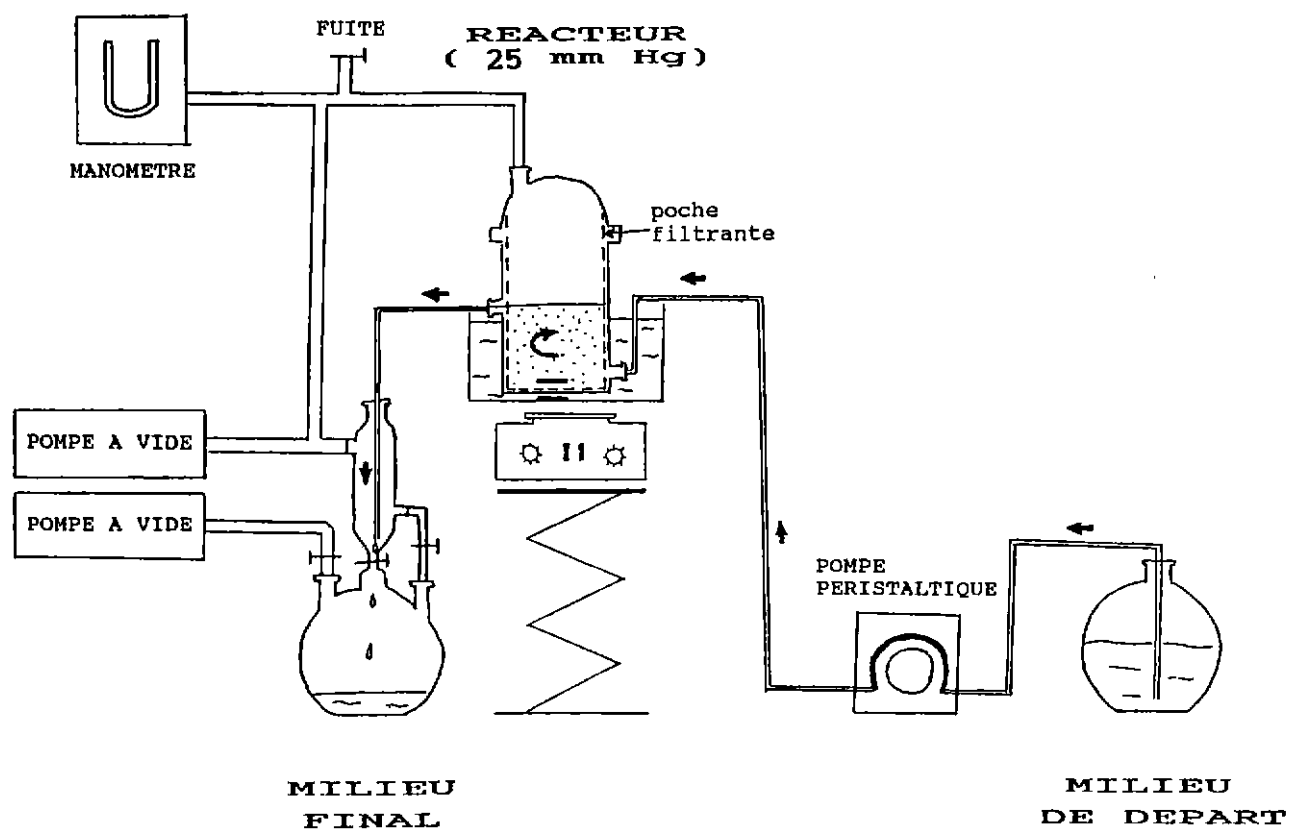


FIG. 3. — Réacteur en continu sous pression réduite après amélioration du montage

On constate une très nette amélioration du rendement de désacidification lorsque l'on diminue la pression et que le temps de contact augmente. Sous 8 mmHg, pression minimale accessible avec ce montage et pour un temps de 13 h, il a été possible de réduire l'acidité de 40,5 à 8,1 % ce qui correspond à un rendement de désacidification de 80 %. Il faut noter que l' $a_w$  du milieu est égale dans ce cas à 0,3, valeur

très proche de celle obtenue dans les conditions optimisées en batch (0,29).

En utilisant le même système, un essai a été effectué avec la lipase SP 435L dans ces mêmes conditions (8 mmHg, 13 h de temps de contact) et a abouti à des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec le Lipozyme (81,5 % de rendement de désacidification).

### Recyclage de l'huile à travers le réacteur

Afin de savoir si l'on pouvait réduire davantage l'acidité de l'huile obtenue après une première désacidification mise en oeuvre dans les conditions précédentes (8 mmHg, 13 h de temps de contact), cette même huile subit un deuxième passage à travers le réacteur. Les résultats obtenus en régime permanent sont très satisfaisants puisqu'en partant d'une huile initialement à 40,5 % d'acidité, l'acidité résiduelle de 8,1 % après le premier passage est alors réduite à 4,3 % seulement. Le rendement global de désacidification est donc près de 90 %.

Ce résultat est très important car il signifie qu'à une plus grande échelle, on pourrait envisager des réacteurs successifs permettant de réduire l'acidité au niveau souhaité.

Dans cette hypothèse, il est également important de noter que l'huile n'a pas besoin de subir un traitement particulier entre chaque réacteur. En effet, le fait de travailler sous pression réduite permet au corps gras issu du premier réacteur d'être encore dans de bonnes conditions d'hydratation pour son passage dans le suivant, l' $a_w$  n'étant pas modifiée grâce à l'élimination de l'eau en continu. L'extrapolation de la réaction de désacidification biocatalysée des huiles hyperacides en système continu paraît donc tout à fait réalisable. Un tel procédé serait toutefois encore relativement coûteux à mettre en oeuvre au niveau industriel.

**Remerciements.** — Nous tenons à remercier le Conseil Général de l'Hérault pour sa contribution financière à la réalisation de cette étude (n° 91.1108).

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRAILLE J., PINA M., MONTET D. (1988) — Biotechnologie des lipides : quelques applications possibles. *Oléagineux*, **43**, (4) : 181-190.
- [2] DUCRET A., PINA M., MONTET D., GRAILLE J. (1989). — Désacidification enzymatique des huiles hyperacides. *Oléagineux*, **44**, (12) : 603-607.
- [3] DUCRET A., PINA M., MONTET D., GRAILLE J. (1992) — Biocatalyzed deacidification : reaction optimization on a model hyperacid oil. *Biotech. Lett.*, **14**, (3) : 281-284.
- [4] DUCRET A., PINA M., MONTET D., GRAILLE J. (1990) — Influence des oryzanols de l'huile de son de riz sur la désacidification enzymatique des corps gras hyperacides. *Oléagineux*, **45**, (3) : 135-138.
- [5] — AFNOR, Corps Gras, Graines oléagineuses. Produits dérivés. 5e éd (1993), NF V03-906, pp 380-383.

## ABSTRACT

### Biocatalyzed deacidification of hyperacid oils in a continuous reactor

A. DUCRET, D. MONTET, M. PINA, J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1993, **48**, N°4, p. 195-200

The conditions used in batch processing for deacidification of hyperacid oils through reesterification biocatalyzed by the lipases of free fatty acids with partial glycerides were used in a continuous system. After successively testing a fixed catalytic bed reactor, with and without trapping of the water formed *in situ*, then a continuous reactor fed by pressure difference, each time with no conclusive success, we developed a continuous reactor at low pressure which gave satisfaction. The results obtained were very encouraging, since the oil to be deacidified merely had to be passed through the reactor twice to reduce acidity by 90%.

**Key words.** — Hyperacid oils, enzymatic deacidification, reesterification, continuous reactor, low pressure.

## RESUMEN

**Desacidificación biocatalizada de aceites hiperácidos en reactor continuo**A. DUCRET, D. MONTET, M. PINA, J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1993, 48, N°4, p. 195-200

Las condiciones utilizadas en batch para la desacidificación de aceites hiperácidos mediante nueva esterificación biocatalizada por lipasas de ácidos grasos libres con glicéridos parciales se establecen en sistema continuo. Usando un aceite ácido de referencia al 40 % de acidez, después de probar sucesivamente un reactor de lecho catalítico fijo sin captura del agua formada en el sitio y con captura del agua, sin resultados convincentes, y luego un reactor continuo alimentado por diferencia de presión, hemos desarrollado un reactor continuo a presión reducida que da resultados satisfactorios. Los resultados logrados son muy alentadores, ya que basta con tratar el aceite a desacidificarse pasándolo 2 veces seguidas dentro del reactor para que la acidez se halle reducida en un 90 %.

**Palabras claves.** — Aceites hiperácidos, desacidificación enzimática, nueva esterificación, reactor continuo, presión reducida.

**BON DE COMMANDE NUMÉROS SPÉCIAUX**A retourner à    *return to :*    reexpidase a :

OLÉAGINEUX - B P 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France) — Tél 67 61 58 00 — Télex 480 762 F — Télécopie : 67 61 59 86

Nom (*Name* - Nombre) . . . . .Adresse (*Adress* - Dirección) . . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

. . . . .

Doc	Quantité ( <i>Quantity</i> - Cantidad)	Prix de vente ( <i>Sale price</i> - Precio de venta)	
		FRANCE (TTC)	ETRANGER
<b>A</b>	.....	75 FF	100 FF
<b>B</b>	.....	100 FF	120 FF.
<b>C</b>	.....	150 FF	200 FF.
<b>D</b>	.....	120 FF	150 FF.
<b>E</b>	.....	90 FF	100 FF
<b>F</b>	.....	135 FF	150 FF.

date . . . . . 199

Signature :

**Règlement par chèque bancaire** (*Enclose bank cheque made out to* - Pago por cheque bancario a) :**CIRAD-CP-OLÉAGINEUX**

Banque Nationale de Paris — Agence Kléber — 51, avenue Kléber, 75116 Paris (France) — RIB : 30004 — 00892 — 00021306936 — clé 21